

Sydämen CA9- immunohistokemia iskemia- reperfuusiovauriassa

Veera Kähönen

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Tampereen yliopisto

Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta

Huhtikuu 2017

Tampereen yliopisto

Lääketieteen ja biolääketieteen yksikkö

VEERA KÄHÖNEN: CA9- IMMUNOHISTOKEMIA ISKEMIA-REPERFUUSIOVAURIOSSA.

Kirjallinen työ, 14s.

Ohjaajat: dosentti Ari Mennander ja professori Timo Paavonen.

Huhtikuu 2017

Avainsanat: hiilihapponhydraasi IX, iskemia, sydämen vajaatoiminta, reperfuusio

TIIVISTELMÄ

Sydämen iskemia-reperfuusioaurio on sydänkirurgian kannalta ongelmallinen ilmiö, sillä se johtaa sydämen vajaatoimintaan lisäämällä vapaiden happiradikaalien määrää sekä aiheuttamalla sydänlihassolujen apoptoosia. Vajaatoimintainen sydän on puolestaan altis komplikaatioille sydänkirurgisissa toimenpiteissä. Tutkimuksemme tavoitteena on selvittää, voisiko hiilihapponhydraasi IX:ää (CA9) käyttää markkerina sydänlihaksen iskemia-reperfuusioauriosta johtuvan hapenpuutteen toteamisessa. CA9 on todettu esiintyvän hypoksiassa ja tiettyjen syöpien yhteydessä.

Aineisto koostui kontrolliryhmästä sekä kymmenestä rotan sydäimestä valetusta parafiinileikkeestä, joille suoritettiin immunohistokemiallinen värjäys CA9- merkkisellä vasta-aineella. Rotan sydämet oltiin kirurgisilla menetelmillä altistettu hapenpuutteelle. Näytteet analysoitiin sokkoutetusti. Poikkileikatuista sydämistä määritettiin laskennallisesti sydämen hapenpuutteen astetta kuvaava ns. iskemiaindeksi, jota verrattiin CA9- värjäytyvyyteen.

Sydämen oikean kammion CA9- pitoisuuden huomattiin korreloivan käänteisesti sydänlihaksen iskemiaindeksiin eli sydämen hapenpuutteen kasvaessa, sydänlihaksen CA9- pitoisuus pieneni. Alustavan kokeellisen työmme perusteella arvelemme sydänlihaksen CA9-pitoisuuden liittyvän sydämen kykyyn vastata hapenpuutteeseen. Herkäksi löydökselle osoittautui varsinkin sydämen oikea kammio.

Sisällys

1 JOHDANTO.....	1
1.1 Hiilihappoanhydraasi IX (CA9)	1
1.1.1 Hiilihappoanhydraasi IX:n säätelijät	1
1.1.2 Hiilihappoanhydraasi IX ja syöpä	2
1.1.3 Hiilihappoanhydraasi IX muissa patologisissa tilanteissa	3
1.2. Iskemia-reperfuusio vaurio.....	3
1.2.1 Sydämen iskemia-reperfuusio vaurio	3
1.2.2 Iskemia-reperfuusio vaurion merkitys sydän- ja rintaelinkirurgiassa.....	4
2 TUTKIMUSMENETELMÄT	5
2.1 Aineisto ja metodit	5
2.2 Tulokset	6
3 POHDINTA.....	6
LÄHTEET	8
LIITTEET	9

1 JOHDANTO

1.1 Hiilihappoanhydraasi IX (CA9)

1.1.1 Hiilihappoanhydraasi IX:n säätelijät

Hiilihappoanhydraasi IX (CA9) on suureen hiilihappoanhydraasientsyymien perheeseen kuuluva proteiini. Hiilihappoanhydraasit katalysoivat hiilidioksidin ja veden välistä reaktiota, jolloin muodostuu bikarbonaattia ja vetyä. (1). Niillä on merkittävä rooli muun muassa elimistön happo-emästasapainon sekä ionitasapainon säätelyssä. CA9 on osa solun sisäkalvon pinnalla esiintyvien hiilihappoanhydraasien ryhmää, johon kuuluu lisäksi CA4, CA12 ja CA14. Muut hiilihappoanhydraasit (CA1, CA2, CA3, CA7 ja CA13) vaikuttavat solujen sytosolissa. (2). Toisin kuin muita hiilihappoanhydraaseja, CA9:ä ei esiinny juurikaan normaaleissa elimistön soluissa, sillä se on erityisesti hypoksiaan eli kudosten hapenpuutteeseen yhdistetty entsyymi. Tästä syystä CA9 ja sen ilmentyminen liitetäänkin erityisesti kasvaimiin. CA9:n ohella CAXII on toinen hiilihappoanhydraaseihin kuuluva isoentsyymi, jota syntetisoidaan tiettyntyyppisten syöpien yhteydessä. (3).

Hypoksian vaikutus CA9:n proteiinisynteesiin välittyy HIF-1- transkriptiotekijän välityksellä, jota kertyy kudoksiin hypoksisissa olosuhteissa. HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) on kahdesta alayksiköstä (α ja β) koostuva proteiini, joista α koostuu edelleen kolmesta alayksiköstä HIF-1 α , HIF-2 α ja HIF-3 α . Muista hypoksiavälitteisistä geeneistä poiketen CA9:n ilmentymistä säätelee ainoastaan nimenomaan HIF-1 α . HIF-1 α :ssa, kuten muissakin α -alayksiköissä, on kaksi happiriippuvaista molekyylikatkaisijaa, jotka säätelevät alayksiköiden määrää sekä transkriptioaktiivisuutta. Hapen läsnäollessa HIF-1 α hydroksyloituu, josta seuraa ubikitinaation välityksellä proteiinin hajoaminen. Hypoksiassa puolestaan HIF-1 α pysyy stabiilina ja toimintakykyisenä eikä hajoa. HIF-1 α sitoutuu CA9:n DNA:ssa sijaitsevaan HRE- promoottoriin (hypoxia-responsive element) ja indusoi CA9:n proteiinisynteesin. (4, 5).

Hypoksian lisäksi myös muut stimuloivat tekijät, kuten hormonit ja sytokiinit vaikuttavat HIF-1:n välityksellä CA9:n ilmentymiseen. Tutkimusten perusteella TGF- β :lla (transforming growth factor β), interleukiini-6:lla (IL-6), interleukiini-1:llä (IL-1) sekä TNF- α :lla (tumor necrosis factor α) on merkittävä rooli HIF-1:n kerääntymisessä kudoksiin myös normaaleissa happiolosuhteissa. (4). CA9:n ohella HIF-1 säätelee useiden muiden hypoksiavälitteisten geenien ilmentymistä ja proteiinisynteesiä. Näihin lukeutuu myös muita syövän kehityksen kannalta olennaisia tekijöitä, kuten glukoositransporttereita, glykolyttisiä entsyymejä sekä angiogeenisiä kasvutekijöitä. (6).

1.1.2 Hiilihappoanhydraasi IX ja syöpä

Hiilihappoanhydraasi IX:ää on huomattu esiintyvän erittäin runsaissa määrin kohdunkaulan karsinoomassa ja munuaisten kirkassolukarsinoomassa sekä joissain määrin muiden karsinoomien, kuten keuhkon, virtsarakon, kaulan ja rinnan karsinoomien solukalvojen pinnalla (4). Kasvainten kohdalla solujen poikkeavan nopea jakautuminen sekä epänormaali ja huonosti järjestäytynyt verisuonitus jättää joitakin alueita ilman kunnollista verenkiertoa, jonka seurauksena kudokset kärsii hapenpuutteesta. Hypoksia onkin tärkein CA9-proteiinisynteesiä indusoiva tekijä. (7). Hypoksian astetta voidaan mitata kasvaimissa erilaisilla menetelmillä, johon kuuluvat muun muassa neulalla suoritettavat elektrodimittaukset, ¹⁹F-MRI-, BOLD - sekä NIRS- kuvantamismenetelmät (8).

Korkea CA9- proteiinin esiintyvyys on merkki kasvaimen huonoennusteisuudesta ja pahanlaatuisuudesta muun muassa kohdunkaulan, pään ja kaulan karsinoomissa sekä sarkoomassa (4). Hypoksian on huomattu syöpätyypistä riippumatta liittyvän maligneihin ja aggressiivisiin syöväen muotoihin. Hypoksian indusoimalla CA9-proteiinin muodostumisella on useita vaikutuksia tuumorin selviytymisen kannalta. Katalysoituaan hiilihappoanhydraaseille ominaisen reaktion, CA9 kuljettaa bikarbonaattia malignien tuumorisolujen sytoplasmaan, jolloin solun sisäpuoli on suojassa ympäristön happamalta pH:lta. Samalla katalyysireaktiossa muodostuneet protonit jäävät solun ulkopuolelle tehden tuumorin kasvu ympäristöstä entistä happamamman. CA9:n pH:hon vaikuttava toiminta johtaa lisäksi ympäröivien normaalien solujen tuhoon sekä kiihdyttää solunulkoisen matriksin hajoamista. Tämä mahdollistaa happamille olosuhteille resistenttien kasvainten tehokkaan jakautumisen, invaasion ja metastasoinnin. (9). *In vivo*- kasvainmalleissa on hiljentämällä CA9-geeni, osoitettu sen merkitys hypoksisissa olosuhteissa kasvaville kasvaimille (10). Poikkeuksena on munuaisten kirkassolukarsinooma, jossa CA9:n esiintyminen päinvastaisesti parantaa ennustetta (4).

Kasvaimen ennusteeseen vaikuttaa olennaisesti se, kuinka tehokkaasti syöpäsolut reagoivat hoitoon. Hypoksiasta kärsivät solut reagoivat huonommin hoitoihin kuin normaalisti happeutuvat solut. Pään ja kaulan alueen sekä kohdunkaulan syöpää tutkivissa aineistoissa huomattiin, että sädehoitojen jälkeinen selviytymisprosentti oli suorassa yhteydessä tuumorisoluista löydetyn CA9:n pitoisuuteen. (11). Sädehoidon lisäksi CA9-proteiinia ilmentävät tuumorit reagoivat huonommin myös kemiallisiin syöpäälääkkeisiin (12).

Syöpien ennusteen arvioinnin ohella CA9:ää pystytään käyttämään myös tiettyjen syöpien diagnostisena markkerina. CA9- pitoisuuden on todettu kasvaneen virtsassa virtsarakon uroteelin syövässä ja useat tutkimukset tukevat CA9:n käyttöönottoa yhtenä diagnoosia ohjaavista

markkereista (13, 14, 15). Virtsarakon syöpä on kuitenkin toistaiseksi ainoa syöpätyyppi, jossa CA9-pitoisuutta voidaan käyttää apuna primaaridiagnostiikassa. Muiden syöpätyyppien kohdalla CA9-pitoisuuden tutkimisella on lähinnä merkitystä syövän vaikeusasteen määrittämisessä.

1.1.3 Hiilihappoanhydraasi IX muissa patologisissa tilanteissa

Uusien tutkimusten mukaan hiilihappoanhydraasi IX:ää esiintyy syöpien lisäksi myös muissa patologisissa tilanteissa. Laskevan aortan leikkauspotilaita tutkinut ryhmä huomasi, että CA9:ää esiintyi suurella osalla leikkauspotilaista. CA9:n esiintymisen arveltiin liittyvän sen kykyyn happamoittaa ympäristöään, jolloin aortan jäykistymistä aiheuttavan, mutta toisaalta suojaavan kalsiumfosfaatin pitoisuus vähenee. Tästä seuraa laskevan aortan seinän degeneraatio ja intiman tulehdustila, jotka johtavat aortan laajentumiseen. (16).

1.2. Iskemia-reperfuusio vaurio

1.2.1 Sydämen iskemia-reperfuusio vaurio

Verenkiertoelinten sairauksista iskeemiset sydäntaudit ovat sekä Suomessa että muualla maailmassa yksi yleisimpiä kuolinsyitä. Nykyaikaiset hoitoketjut ovat yhä tehokkaampia, jonka seurauksena kuolleisuus sepelvaltimotautiin on pienentynyt viime vuosikymmenien aikana. (17). Sydäninfarktista selviää siis yhä useampi potilas. Iskemian hoitona toimii poikkeuksesta verenkierron uudelleenpalauttaminen mahdollisimman nopeasta hapenpuutteesta johtuvan vaurion minimoimiseksi. Kun hapenpuutteesta kärsivään sydänlihakseen palautuu verenkierto (sydämen reperfuusio), kardiomyosyyteissä, interstitiaalisoluissa sekä verisuonissa tapahtuvat muutokset eivät aina ole sydämen toiminnan kannalta myönteisiä. Tällöin puhutaan sydämen iskemia-reperfuusio vauriosta. Haitalliset muutokset voivat pahimmassa tapauksessa johtaa sydämen toiminnan vajaukseen. (18). Iskemia-reperfuusio vaurion olemassaolo huomattiin jo 1960-luvulla, kun sydämen reperfuusion todettiin lisäävän sydänlihassolujen nekroosia (19).

Iskemian aiheuttaman vaurio sydämessä riippuu iskemian laajuudesta sekä sen kestosta. Iskemia aiheuttaa useita muutoksia sydänlihassolujen toiminnassa, joista tärkeimpiä ovat lihassolujen aineenvaihdunnan muuttuminen aerobisesta anaerobiseksi ja tästä seuraava pH:n lasku sekä ATP-varastojen tyhjeneminen. (20).

Iskemia-reperfuusio vaurion mekanismit ovat moninaiset. Kokeellisissa tutkimuksissa on huomattu, että iskeemisen alueen reperfuusion seurauksena muodostuu reaktiivisia happiyhdisteitä (ROS, reactive oxygen species), jotka aiheuttavat sydänlihaksen oksidatiivista stressiä. Infarktin aikana vapautuu kemokiinejä, jotka houkuttelevat paikalle neutrofiilejä. Neutrofiilejä kulkeutuu aluksi pelkästään infarktialueelle ja myöhemmin myös muualle myokardiumiin ja ne vapauttavat hajottavia

entsyymejä sekä lisää ROS- yhdisteitä. Sydänlihassolujen kuolemaa selittäviä tekijöitä ovat lisäksi solunsisäisen kalsiumpitoisuuden nousu sekä pH:n nopea palautuminen takaisin normaaliksi. Kaikkien yllämainittujen tekijöiden seurauksena mitokondrion sisäkalvolla sijaitsevat PTP-kanavat aukeavat. PTP-kanavien aukeaminen johtaa mitokondrion kalvopotentiaalin muutoksiin sekä oksidatiiviseen fosforylaatioon, jolloin solun normaali toiminta estyy ja solu kuolee. (21).

1.2.2 Iskemia-reperfuusioaurion merkitys sydän- ja rintaelinkirurgiassa

Sydän- ja rintaelinkirurgian toimenpiteisiin kuuluu keskeisenä osana avosydänleikkaukset, johon kuuluvat tärkeimpinä sepelvaltimoiden ohitusleikkaukset sekä läppäleikkaukset. Useimmissa avosydänleikkauksissa sydän joudutaan pysäyttämään sydän-keuhkokoneen avulla optimaalisten leikkausolosuhteiden saavuttamiseksi. Sydän eristetään verenkierrossa pihdittämällä nouseva aorta. Sydämen oikeaan eteiseen palaava veri ohjataan sydän-keuhkokoneeseen, jossa se hapetetaan ja siitä poistetaan hiilidioksidia. Koneessa hapetettu veri pumpataan valtimoverenkiertoon pihdin distaalipuolelle. (22).

Sydän-keuhkokoneen käyttö itsessään aikaansaa haitallisia muutoksia veressä. Veren jatkuva kulkeutuminen koneen putkia pitkin, joita ei ole normaalien verisuonten tapaan vuorattu endoteelikerroksella, aktivoi neutrofiilejä. Neutrofiilien aktivoituminen johtaa aiemmin kuvatulla tavalla vapaiden happiradikaalien lisääntyneeseen tuotantoon. Lisäksi avosydänleikkauksen aikana tai sen jälkeen potilaalle annetut verituotteet lisäävät sydämen oksidatiivista stressiä, sillä niiden antioksidatiiviset ominaisuudet ovat heikentyneet. Jotkut elimistön osat saattavat leikkauksen aikana altistua hypoksialle, jonka seurauksia on kuvattu kappaleessa 1.2.1. Teoreettinen riski potilaalle on myös sydän-keuhkokoneen poiskytkeminen ja normaalin verenkierron palauttaminen, jolloin varsinainen iskemia-reperfuusioauriota tapahtuu. (23).

Sekä iskemia että verenkierron palautuminen sydänlihakseen voivat siis aiheuttaa sydänlihaksen tuhoa. Kardiomyosyytit ovat pitkälle erikoistuneita soluja eivätkä kykene nykykäsityksen mukaan välttämättä uusiutumaan. Tämän seurauksena vaurioituneita sydänlihassoluja ei pysytä korvaamaan vaan muodostuu arpikudosta. Kompensoidakseen menetettyä toimivaa lihaskudosta, sydän muokkaa itseään kasvattamalla jäljelle jääneiden sydänlihassolujen kokoa. Muodostuneet uudet lihassytt eivät kuitenkaan pysty supistumaan yhtä tehokkaasta kuin jo olemassa olevat solut ja seuraa äkillinen sydämen toiminnan vaje. (24). Erityisesti vasemman kammion funktio on tärkeä avosydänleikkauksiin liittyvä riskitekijä. Mikäli kammion supistumiskykyä kuvaava ns. ejektiofraktio on alle 20 %, leikkauskuolleisuusriski kasvaa yli kolminkertaiseksi normaalitoimintaiseen sydämeen verrattuna. Leikkauskuolleisuusriskiinkin vaikuttaa vasemman kammion funktion ohella siihen usein liittyvät läppäviat, läppävuotoihin kohdistuvien toimenpiteiden

tarve sekä sydämen oikean puolen vajaatoiminta. (22). Esimerkiksi sydämen oikean kammion on huomattu reagoivan herkästi sydänlihaksen iskemiaan (25).

Tutkimuksemme tarkoituksena on tutkia kokeellista iskemia-mallia käyttäen, kuinka iskemia-reperfuusioaurion ja hypoksia voivat liittyä CA9- positiivisuuteen. Käytämme rotan sydänsiirtomallia, jonka avulla pystymme mallintamaan iskemian seurauksena syntyneitä vajaatoimintaista sydäntä. Aiempien tutkimustemme perusteella näyttää siltä, että histologisesti muutokset ovat ainakin osittain tulehdusvälitteisiä ja mielenkiintomme kohdistuu tässä tutkimuksessa CA9:ään.

2 TUTKIMUSMENETELMÄT

2.1 Aineisto ja metodit

Alustavassa tutkimuksessa käytimme kymmentä Fischer 344- merkkistä rottaa, joille suoritettiin heterotrooppinen sydänsiirto vatsaonteloon. Sydänsiirron lisäksi vasen laskeva sepelvaltimo suljettiin, josta aiheutui sydänlihaksen iskemia. Toimenpiteen aikana rottien sydänsiirrännäinen kärsi hapenpuutteesta ja iskemia-reperfuusioaurio ilmaantui, kun verenkierto siirrännäiseen palautettiin jälleen. Rotat lopetettiin joko yhden tai kahden päivän kuluttua riippuen eläimen kliinisestä voinnista. Sydämet otettiin talteen histologista ja immunohistologista tutkimusta varten. Kontrolliryhmä käsitti neljä operoimatonta eläintä.

Asianmukaista kivunlievitystä sekä anestesiaa käytettiin ja rottien lopetuksessa noudatettiin kansainvälisiä sopimuksia ja suosituksia. Tutkimuksella on Etelä-Suomen aluehallintoviraston myöntämä koe-eläinlupa.

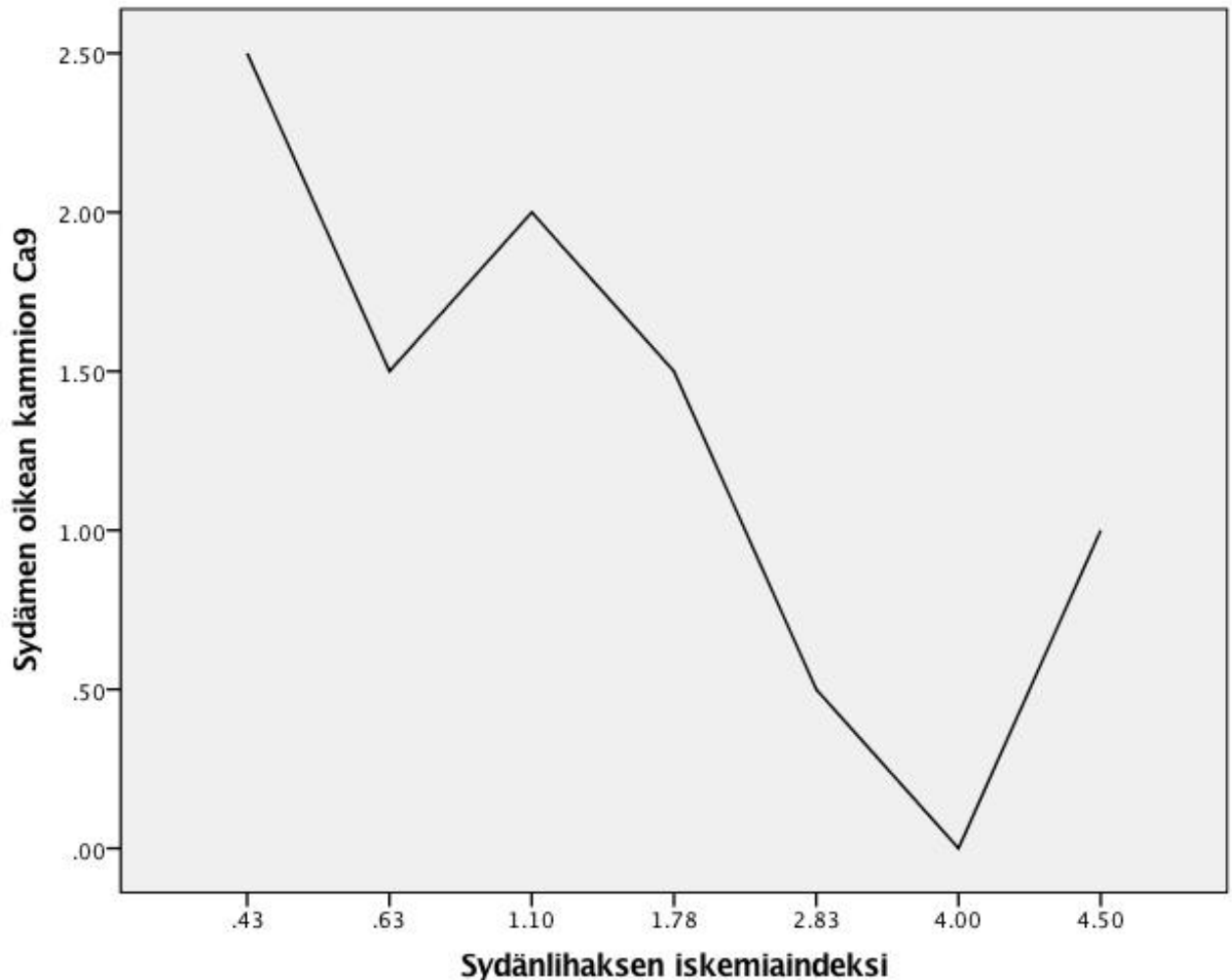
Sydännäytteistä valettiin parafiinileikkeet, ja suoritettiin histologinen H&E- värjäys. Poikkileikatuista sydämistä määritettiin histologisesti sydänlihaksen iskemiaindeksi. Iskemiaindeksi määritettiin tutkimuksessamme laskemalla histologisesta näytteestä löytyvästä sydänlihaksen pienen valtimon seinämästä tummana värjäytyvät, pienet, terävät, hapenpuutteesta kärsivät tumat ja kyseisten suonten seinämien solujen vaahtoutumat eli vakuolisaation lukumäärä. Näiden yhteenlaskettu summa jaettiin valtimon seinämästä löytyneiden pyöreiden, normaalien tumien lukumäärällä.

Immunohistokemiallinen värjäys suoritettiin CA9- merkkisellä vasta-aineella. CA9- positiivisuus todettiin solun värjäytymisellä ruskeana (liitteen 1 kuvat 1 ja 2).

2.2 Tulokset

Pearsonin korrelaatiokertoimen mukaan sydämen oikean kammion CA9- pitoisuus korreloi käänteisesti sydänlihaksen iskemiaindeksiin ($p=0.026$, $R=-0.814$).

Taulukko 1.



3 POHDINTA

Tutkimusten tulosten mukaan tehtyjen analyysien perusteella huomasimme, että sydämen oikean kammion CA9- pitoisuus korreloi käänteisesti sydänlihaksen iskemiaindeksiin (taulukko 1). Aiemman tiedon perusteella olisimme odottaneet päinvastaista tilannetta, jossa CA9- pitoisuus ja kudoksen iskemiaa kuvaava iskemiaindeksi olisivat korreloineet positiivisesti, sillä CA9- proteiinin ilmentymistä on tyypillisesti pidetty markkerina iskemiasta. Tutkimuksemme perusteella näyttäisikin siltä, että CA9- proteiinin ilmentyminen saattaa kuvata kudoksen kannalta stabiilia tilaa, jossa kudoksesta pyrkii korjaamaan itseään ja toimisikin näin iskemialta suojaavana tekijänä. Muun muassa

immuunipuolustuksen kannalta tärkeän CD4- glykoproteiinin on todettu käyttäytyvän vastaavalla tavalla: proteiinia esiintyy runsaasti nousevan aortan dilataatiopotilailla, mutta aortan dissekatiosta kärsivillä sitä ei juurikaan ilmennyt (26). Hypoteesin selvittäminen vaatii lisätutkimusta.

Tutkimuksemme heikkoutena oli pieni aineisto. Vaikka trendi CA9- ilmentymisen ja iskemiaindeksin välillä oli selvä, olisi suurempi aineisto tuonut tuloksiin lisää luotettavuutta. Sama pätee verrokkiryhmän kokoon. Lisäksi olisi mielenkiintoista seurata miten näytteiden ikä vaikuttaa tuloksiin. Käyttämämme sydänleikkeet olivat joko yksi tai kaksi päivää operaation jälkeen leikatuilta rotilta, joten iskemian ja akuutin vajaatoiminnan kaikki vaikutukset eivät vielä välttämättä näy näytteissä. Leikkaukset suorittivat lääketieteen opiskelijat yhdessä vastuuhjaajan kanssa, joten leikkauksen laadun tasaisuus voi vaihdella jonkin verran, etenkin näin pienessä aineistossa. Emme usko sillä olleen kuitenkaan suurta merkitystä tulosten kannalta. Tulevaisuudessa tulisi suorittaa lisää leikkauksia suuremman datan keräämiseksi ja pyrkiä pidentämään operaation ja lopettamisen välistä aikaa, ei kuitenkaan koe-eläinten hyvinvoinnin kustannuksella. Tämä saattaa vaatia parempien leikkausmenetelmien kehittämistä tai vähintäänkin tutkimusryhmän jäsenten kehittymistä nykyisen leikkaustekniikan suorittamisessa. Lisätutkimus aiheesta voisi tarjota arvokasta tietoa CA9- proteiinin ilmentymisestä sekä sen mahdollisesta käytöstä sydänkirurgisen potilaan tilan ja riskin arvioinnissa.

Syventävien opintojen työni käsitti perehtyneisyyden CA9- proteiiniin liittyvään kirjallisuuteen sekä tutustumisen tieteelliseen kokeellisen sydänkirurgian alaan kuuluvaan tutkimukseen. Käytännön osuuteni syventävien osalta käsitti deskriptiivisen kokeellisen immunohistokemiallisen työn, jossa siis määritettiin sokkoutetusti CA9- positiivisuus sydänlihaksen poikkileikkauksesta.

Syventävien opintojen suorittaminen oli opettavainen kokemus. Kirjallisuuskatsauksen tekeminen opetti minulle tiedonhakutaitoja sekä kriittistä tiedon arviointia, josta tulee varmasti olemaan hyötyä tulevaisuudessa millä tahansa tutkimusalalla. Immunohistokemiallinen tutkimus puolestaan tarjosi mahdollisuuden tutustua patologiaan opettaen samalla yleislääkärillekin hyödyllistä mikroskoopin käyttötaitoa sekä normaalien ja epänormaalien solu- ja kudoksetien tunnistamista. Oli myös kiehtovaa päästä tutustumaan kokeellisen sydänkirurgian tutkimukseen, jonka tarpeellisuuden sydänkirurgian tutkimuksessa ymmärsin tutkimusprojektin aikana. Opin lisäksi lukuisia yleisiä tieteellisen tutkimuksen tekoon liittyviä asioita, kuten tutkimusryhmässä toimimista sekä tieteellisen julkaisun kirjoittamis- ja julkaisuprosessin kulkua.

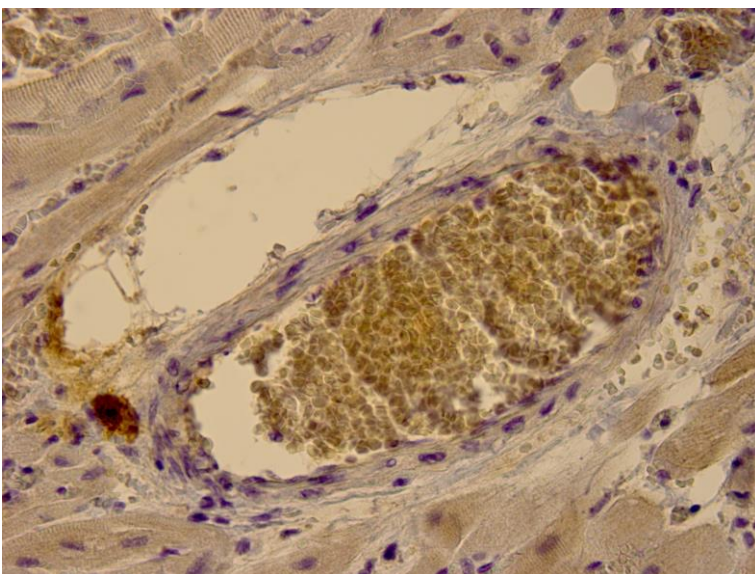
LÄHTEET

1. Supuran CT. Carbonic anhydrases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2013; 21(6): 1377-1378.
2. Tanaka N, Kato H, Inose T, Kimura H, Faried A, Sohda M, Nakajima M, Fukai Y, Miyazaki T, Masuda N, Fakuchi M, Kuwano H. Expression of carbonic anhydrase 9, a potential intrinsic marker of hypoxia, is associated with poor prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 2008; 99(9): 1468-1475.
3. Supuran CT, Winum J-Y. Carbonic anhydrase inhibitors in cancer therapy: an update. *Future Med Chem* 2015; 7(11): 1407-1414.
4. Kaluz S, Kaluzová M, Liao SY, Lerman M, Stanbridge EJ. Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? *Biochim Biophys Acta* 2009; 1795(2): 162-172.
5. Van den Beucken T, Koritzinsky M, Niessen H, Dubois L, Savelkoul K, Mujcic H, Jutten B, Kopacek J, Pastorekova S, van den Kogel AJ, Lambin P, Voncken W, Rouschop KMA, Wouters BG. Hypoxia-induced Expression of Carbonic Anhydrase 9 is Dependent on the Unfolded Protein Response. *J Biol Chem* 2009; 284(36): 24204-24212.
6. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible Expression of Tumor-associated Carbonic Anhydrases. *Cancer Res* 2000; 60(24): 7075-7083.
7. Marie-Egyptienne DT, Chaudary N, Kalliomäki T, Hedley DW, Hill RP. Cancer initiating-cells are enriched in the CA9 positive fraction of primary cervix cancer xenografts. *Oncotarget* 2017; 8(1): 1392-1404.
8. Sun X, Niu G, Chan N, Shen B, Chen X. Tumor Hypoxia Imaging. *Mol Imaging Biol* 2011; 13(3): 399-410.
9. Chiche J, Ilc K, Laferriere J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counter-acting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res.* 2009; 69(1): 358–368.
10. Kockar F, Yildirim H, Sagkan RI, Hagemann C, Soysal Y, Anacker J, Hamza AA, Vordermark D, Flentje M, Said HM. Hypoxia and cytokines regulate carbonic anhydrase 9 expression in hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World J Clin Oncol* 2012; 3(6): 82-91
11. Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ. Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol.* 2003; 67(1): 3-15.
12. Svastová E, Hulíková A, Rafajová M, Zat'ovicová M, Gibadulinová A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastoreková S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett.* 2004; 577(3): 439-445.
13. de Martino M, Lucca I, Mbeutcha A, Wiener HG, Haitel A, Susani M, Shariat SF, Klatte T. Carbonic Anhydrase IX as a Diagnostic Urinary Marker for Urothelial Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2015; 68(4): 552-554.
14. Klatte T, Seligson DB, Rao JU, Yu H, de Martino M, Kawaoka K, Wong SG, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Carbonic anhydrase IX in bladder cancer: a diagnostic, prognostic, and therapeutic molecular marker. *Cancer* 2009; 115(7): 1448-14458.
15. Rosser CJ, Ross S, Chang M, Dai Y, Menqual L, Zhang G, Kim J, Urquidí V, Alcaraz A, Goodison S. Multiplex protein signature for the detection of bladder cancer in voided urinary samples. *J Urol.* 2013; 190(6): 2257-2262.

16. Niinimäki E, Muola P, Parkkila S, Kholová I, Haapasalo H, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX deposits are associated with increased ascending aortic dilatation. *Scand Cardiovasc J* 2016; 50(3): 162-166.
17. Tilastokeskus. Kuolemansyyt 2015.
18. House SL, Castro AM, Lupu TS, Weinheimer C, Smith C, Kovacs A, Ornitz DM. Endothelial fibroblast growth factor receptor signaling is required for vascular remodeling following cardiac ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016; 310(5): 559-571.
19. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in a dog. *Arch Pathol* 1960; 70: 68-78.
20. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012; 298: 229-317.
21. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Eng J Med* 2007; 357: 1121-1135.
22. Duodecim. Kardiologia 2016.
23. Zakkar M, Guida G, Suleiman M-S, Angelini GD. Cardiopulmonary bypass and oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015: 189863.
24. Smiley D, Smith MA, Carreira V, Jiang M, Koch SE, Kelley M, Rubinstein J, Jones WK, Tranter M. Increased fibrosis and progression to heart failure in MRL mice following ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*. 2014; 23(6): 327-334.
25. Aronson D, Darawsha W, Atamna A, Kaplan M, Makhoul BF, Mutlak D, Lessick J, Carasso S, Reisner S, Agmon Y, Dragu R, Azzam ZS. Pulmonary hypertension, right ventricular function, and clinical outcome in acute decompensated heart failure. *J Card Fail*. 2013; 19(10): 665-671.
26. Niinimäki E, Paavonen T, Valo T, Tarkka M, Mennander A. Lack of Cd4 deposition may reveal susceptibility for ascending aortic dissection. *Scand Cardiovasc J*. 2012; 46(3): 177-182.

LIITTEET

Kuva 1



Kuva 2

